

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2553180号

(45) 発行日 平成 8 年 (1996) 11 月 13 日

(24) 登録日 平成 8 年 (1996) 8 月 22 日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/79		8517-4H	C 0 7 K 14/79	
1/22			1/22	
1/34			1/34	
14/47			14/47	
C 1 2 N 9/08			C 1 2 N 9/08	

請求項の数 8 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願昭63-509492	(73) 特許権者	999999999
(86) (22) 出願日	昭和63年(1988)11月25日		スベンスカ、メジェリールナス、リクス フェレニングス、エコノミー-アクチェ ボラーグ スエーデン国ストックホルム、ボック ス、24
(65) 公表番号	特表平3-502921	(72) 発明者	ブルリング、ハンス
(43) 公表日	平成 3 年 (1991) 7 月 4 日		スエーデン国ルンド、ヘプディングパー ゲン、15
(86) 国際出願番号	P C T / S E 8 8 / 0 0 6 4 3	(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外 2 名)
(87) 国際公開番号	W O 8 9 / 0 4 6 0 8		
(87) 国際公開日	平成 1 年 (1989) 6 月 1 日	審査官	藤原 浩子
(31) 優先権主張番号	8 7 0 4 7 1 9 - 7		
(32) 優先日	1987年11月27日	(56) 参考文献	特開 昭48-35061 (J P, A) 特開 昭62-19523 (J P, A) Rev. r oun, B i o c h i m. , V o l. 21, N o. 2, P. 81- 91 (1984)
(33) 優先権主張国	スウェーデン (S E)		

(54) 【発明の名称】 乳清からのラクトペルオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】乳清からのラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出する方法であって、乳清をマイクロ濾過し、これをラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを選択的に吸着させるため約 1 ~ 1.5 床容積 / 分の高流量で強陽イオン交換体の床中を通過させた後、pH が約 6.5 で濃度が 0.10 ~ 0.4M の塩溶液でラクトペルオキシダーゼを、濃度が 0.5 ~ 2M の塩溶液でラクトフェリンを、連続的且つ選択的に溶出させることを特徴とする方法。

【請求項 2】ラクトペルオキシダーゼを溶出する前に、前記強陽イオン交換体を濃度が 0.01 ~ 0.15M の塩溶液で溶出する、請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 3】前記塩溶液が無機アルカリ、アルカリ土類またはアンモニウム塩の溶液である、請求の範囲第 1 項

2

に記載の方法。

【請求項 4】乳清の pH を 5.9 ~ 9.0 に調整した後、陽イオン交換体を通過させる、請求の範囲第 1 項 ~ 第 3 項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】乳清の pH が約 6.5 に調整される、請求の範囲第 4 項に記載の方法。

【請求項 6】マイクロ濾過を、細孔直径が 0.10 ~ 2 μ m のマイクロフィルターで行う、請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれか一項に記載の方法。

10 【請求項 7】前記マイクロフィルターの細孔直径が 0.4 ~ 1.5 μ m である、請求の範囲第 6 項記載の方法。

【請求項 8】塩溶液で溶出したラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンをそれぞれ濃縮し、脱塩し、凍結乾燥する、請求の範囲第 1 項 ~ 第 7 項のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明は、乳清からのラクトペルオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法に関する。乳清とはスキムミルクとホエーの両者を意味する。

チーズの製造では、多量のホエーが副生成物として得られる。ホエーの乾燥固形物含有は約6%であり、ほぼ下記のようなものから構成されている。

	重量%
ラクトース	4.6
タン白質	0.6、その中の
ラクトペルオキシダーゼ	0.0020
ラクトフェリン	0.0030
脂肪	0.05 (分離後)
塩	<u>0.7</u>
固形物含量	約6.0

乾燥固形物含量の約10~12%を構成するタン白質画分は、多数の異なるタン白質成分から成っている。最大のもは、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミンおよびウシ血清アルブミンである。多数の生物活性成分も、タン白質画分に属し、例えば免疫グロブリン、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトフェリンおよびリゾチームである。

ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンは、抗菌活性を有する。食品技術における新たな状況においておよび化学技術や医学の分野で用いられる天然の抗菌性物質の抽出に大きな関心が持たれている。

スキムミルクとホエーでは（および元のミルクでは）これらの物質の含量は低い。ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの含量は、ウシの授乳状態によって変わるが、15~50mg/リットルで含まれる。したがって、これらの生物活性成分をキログラムの量で抽出し易くするには、多量のホエー（ミルク）を濾過しなければならない。

ミルク/ホエーからラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンをそれぞれ単離するためのプロセス光学条件は、これら2種類のタン白質の等電点（pI）が約9.5であるが、ホエータン白質の主要部分の等電点は約5.1~5.4であり、カゼインの等電点は約4.6であるという事実に基づいている。それ故、ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを分離するのに基本的に好適な方法は、ミルク/ホエーをpH<6で陽イオン交換体と接触させて選択的に吸着させることであり、この場合に、ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンとの真の正電荷を用いてこのpHで陰電荷を有する他のミルクタン白質と区別するのである。

研究のために少量でラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを単離する伝統的な方法は、しばしばゲル濾過と組み合わせて使用される沈降法およびイオン交換クロマトグラフィを用いる方法であり、モリソン、エム（Morrison, M）、ハミルトン、エイチ・ピー（Hamilton, H-

B.）、シュトッツ、イー（Stotz, E）、J. Biol. Chem., 228:767 (1957)；モリソン、エム（Morrison, M）、フルトクイスト、ピー・イー（Hultquist, P-E）、J. Biol. Chem., 238:2847 (1963)を参照されたい。これらの方法は、経済的に擁護し得る程度に前記の生物活性を有する成分を多量に調製するのには適さない。

米国特許第4,436,658号明細書（ペヴロスセット（Pevrosuset））には、シリカカラムによるカゼイン不含乳清（ホエー）からのラクトフェリンの吸着が開示されている。乳清のpHを7.7~8.2に調製した後、カラムに吸着させるのである。免疫グロブリン、ラクトフェリンおよびラクトペルオキシダーゼがカラムに付着する。吸着工程の後に、pH<4の希釈した塩溶液で溶出を行う。吸着したタン白質は、特にラクトペルオキシダーゼに関しても選択的には溶出ししない。約5gのシリカを保持するカラムでは、ホエー1リットルを処理することができる。この先行技術による方法は、工業的規模での適用には適さないものと考えねばならない。

ザグルスキイ（Zagulski）らは、Prace in materialy Zootechniczne, 20, (1979), 87~103頁にラクトフェリンを得るパッチ法であって、弱陽イオン交換体を用いてこれをミルクと混合する方法を記載している。平衡に達したならば、イオン交換体をカラムに入れて、吸着したタン白質を塩溶液で溶出させるのである。したがって、この方法はパッチ法に基づいており、高純度のラクトフェリンを得るには第二のイオン交換工程で更に精製を行わなければならない。

同様な方法はベルギー国特許第901,672号明細書（ジェイ・ピー・プリールス（J.P. Prieels）とアール・パイパー（R. Peipper）、オレフィナ・エス・エイ（Olefina S.A.））に記載されている。この方法では、アルギン酸カルシウムを基剤とするイオン交換体であって、イオン交換官能価をジルコニウム、チタン、石英またはアルミニウムの酸化物の添加によって得たものが用いられる。ミルク/ホエーを充填カラム中でイオン交換体と接触させ、またはタンク中で混合することによって、等電点が7.5より高いタン白質を吸着させる。平衡に達したならば、ゲルを機械的に分離して洗浄装置に供給し、塩化カルシウム溶液で溶出させる。アルギン酸カルシウムと接触する総ての流体は少なくとも0.1%のCaCl₂を含み、ゲルが溶解するのを防止するものでなければならない。ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンはこの溶出では分別されないが、別の精製工程で分別を行わなければならない。

カラム法で商業的に確立されたイオン交換法で処理されない理由として、前記のベルギー国特許明細書は、媒質中に球状の脂肪とタン白質の凝集体の粒子が発生することによってイオン交換体の目詰りを生じるという克服し難い問題を挙げている。

英国特許第2,179,947号明細書には、ミルクからのラ

クトランスフェリン抽出法が開示されている。この方法を行って、ホエーに限外濾過を施すことによって（ラクトランスフェリンを含有する）ホエーのタン白質含量を約5倍に濃縮した後、そのpHとイオン強度を調製するようにする。こうして処理された乳清を非常に低速度（約0.03床容積／分）でイオン交換カラム、好ましくは弱陽イオン交換体を通過させる。このカラムを、ラクトフェリンが溶出されるときに0.4Mまで増加するイオン強度勾配を有する溶液で低速度で溶出させる。これは小規模法であり、ラクトフェリンを工業的な製造には適さない。弱陽イオン交換体を使用することによって、容積が低くなる。天然の乾燥固形物含量に転換された100床容積の量のホエーを、それぞれの溶出の間にイオン交換カラムを通過させることができる。脂肪とタン白質粒子によって生じるイオン交換フィルターの目詰りの問題は、この先行技術によっては解決されていない。

ホエー／スキムミルクからラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを経済的に回収するには、工業的に適用可能な方法に次のような要件を与えることができる。

(1) 吸着マスの選択的処理能力が高い。ラクトペルオキシダーゼ／ラクトフェリンの乳清中での含量は低いので、1回の溶出で処理することができる乳清の容積は大きくなければならない。

(2) 吸着相における流量が高い。（通常のクロマトグラフィ法では低速、0.01～0.10床容積／分で処理するのが普通である）。この理由は、粒度が小さいため、床は通常は圧降下が大きく、吸着法の反応速度には流量を高くする必要があることがしばしばあるからである。

(3) この方法は衛生的でなければならず、これは吸着マスは少なくともpH13～14の灰汁で処理しなければならないことを意味する。

本発明の目的は、乳清（ホエー）からラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出するための前記の要件を満足する方法を得ることである。

本発明は、乳清からのラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出する方法に関し、この方法は乳清をマイクロ濾過し、これを高流量で強陽イオン交換体を通過させ、ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを異なる濃度を有する塩溶液で選択的に連続的に溶出させることを特徴とする。

本発明によれば、単一のイオン交換工程で2種類の異なる血清タン白質の純粋な画分を調製する方法が提供される。これは、以前は工業的規模では行われていなかったものである。先行技術による工業的規模でこれらのタン白質を抽出する方法では、2または3の精製工程を必要とした。

血清またはホエー中で球状脂肪およびタン白質凝集体のような粒子の生成によって起こるイオン交換体の目詰りの上記の問題は、乳清（ホエー）をマイクロ濾過（例えばいわゆる十字流濾過法）した後、イオン交換床に接

触させる本発明によって解決される。マイクロフィルターの好適な細孔度を選択することによって、目詰りを引き起こす脂肪とタン白質の凝集体粒子を除去することができる。好適なマイクロフィルターの細孔直径は0.10～2 μm 、好ましくは0.4～1.5 μm である。

本発明による方法の出発材料としては、乳清（ホエー）すなわち脂肪とガゼインを除いたミルクが用いられる。乳清を最初にマイクロ濾過によって処理して、脂肪とタン白質凝集体粒子の残渣をいわゆる十字流法で除去する。マイクロ濾過を行った乳清を、次に高速（約1～1.5床容積／分）で強陽イオン交換体であって、ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを選択的に吸着するものを充填したカラムを通過させる。この陽イオン交換体は、優れた速度および吸着速度特性と、乳清の約1000床の容量を有する。これは、最も弱く結合しているラクトペルオキシダーゼが漏出する、すなわちイオン交換マスがこれらのタン白質で飽和されるまでに約1000床容積の乳清が通過することができることを意味する。吸着相の初めと終りとの間には、圧降下は極僅かしか増加しない。

イオン交換マスの溶出は、乳清をカラムから緩衝後、好ましくは乳清のpH6.5のリン酸緩衝液で洗い出すことによって開始する。次いで、不純物があるとすればこれが、好ましくは無機アルカリ、アルカリ土類またはアンモニウム塩の弱塩溶液、例えば0.075M NaClを含む緩衝液で溶出する。

この予備的溶出の後、所望なタン白質を、異なる濃度で前記の塩から選択される塩溶液を含む緩衝液で選択的に溶出する。例えば、ラクトペルオキシダーゼの溶出を0.10～0.4Mの範囲の塩濃度で行い、ラクトフェリンの溶出を0.5～2Mの塩濃度で行う。

この処理の後、関連のタン白質を約500倍に濃縮した。

純粋なタン白質画分を集めた後、好ましくは限外濾過の後に脱塩および凍結乾燥を行うことによって更に濃縮して、純粋なタン白質画分が約90%である商業製品を得るようにする。

1kgのラクトペルオキシダーゼと1kgのラクトフェリンを製造するためには、それぞれ約65および45m³のホエーが必要である。抽出した成分の純度は90%を上回る。これはイオン交換体を適当に選択し、pHおよび塩濃度が重要なパラメーターである吸着および溶出条件を慎重に選択することによって得られる。

本発明を下記の実施例と添付の図面によって詳細に説明する。

第1図は、本発明による方法の好ましい態様の模式図であり、

第2図は、イオン交換カラムからラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを溶出するときの紫外線吸収スペクトルを表わし、

第3図は、本発明による分別を行った後のラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純度を示すクロマトグラムである。

実施例

pH6.5で殺菌しスラッジを遠心分離したスイートホエー100リットルを、50℃で十字流法でマイクロ濾過した。マイクロ濾過によって、粒状の脂肪の残っている残渣を、生成するタン白質凝集体と共に除去した。マイクロフィルターの細孔度は1.4 μ mであった。

冷却した後、ホエーを、アガロースを基剤とする特別の処理した強陽イオン交換体（Sーセファロース、急流、ファルマシア（Pharmacia））80mlを充填したイオン交換カラムを通過させた。床の高さ約4.1cmであり、カラム中の流量は100ml/分であり、1.25床容積/分の流量に相当した。実験の開始時におけるカラムの前の圧降下は0.26バールであった。15時間後に、流量は0.28バールの圧降下で100ml/分であった。ホエー約80～90リットルがカラムを通過したときラクトペルオキシダーゼの漏出が起り、すなわち約1000床容積であった。

次に、ホエーの流れを遮り、溶出相をリン酸緩衝液0.

03MKH₂PO₄、pH6.5でカラムからのホエーを洗浄し、0.075M NaClを含むリン酸緩衝液で不純物をイオン交換体から溶出させることによって開始した（第1図）。ラクトペルオキシダーゼを0.3M NaClを含むリン酸緩衝液で溶出した後、ラクトフェリンを0.9M NaClを含むリン酸緩衝液で溶出させた（第2図参照）。

画分を集めた後、集めた画分をセファデックスカラム中でゲル濾過によって脱塩し最後に凍結乾燥した。

イオン交換カラムを、最初に2.0M NaClで洗浄した後、1.0M NaOHで洗浄することによって清掃した後、カラムを再び実験に用いた。

イオン交換後のラクトペルオキシダーゼの収率:96.5 %、

溶出後に集められた画分の純度: $A_{412} / A_{280} = 0.84^*$

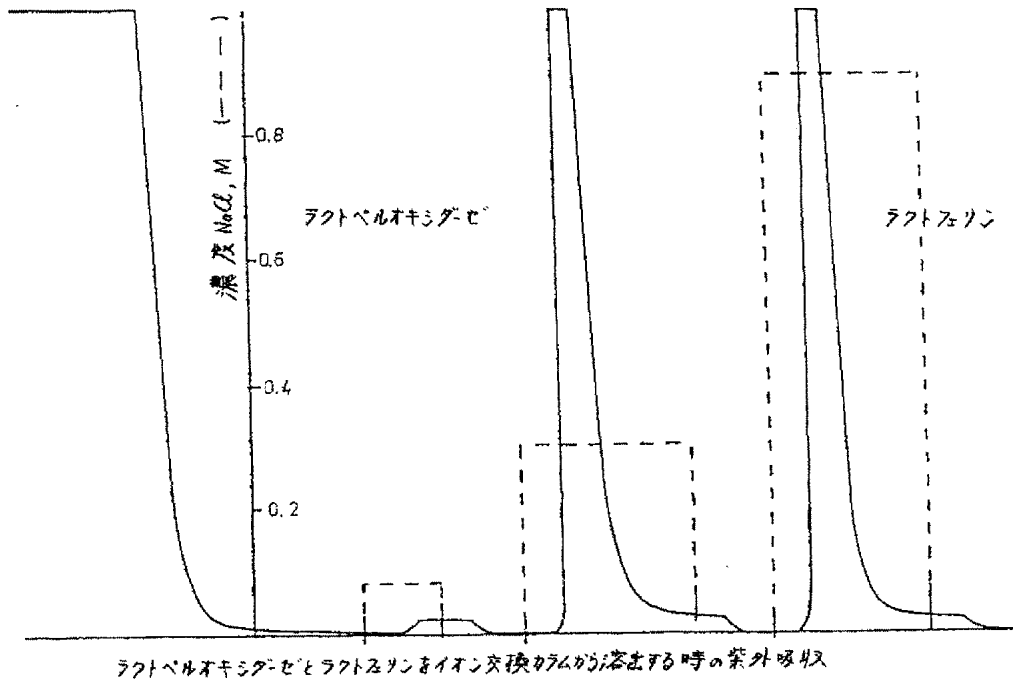
活性として計算した凍結乾燥後の方法における総収率:90 %

凍結乾燥した調製物の純度: $A_{412} / A_{280} = 0.87^*$

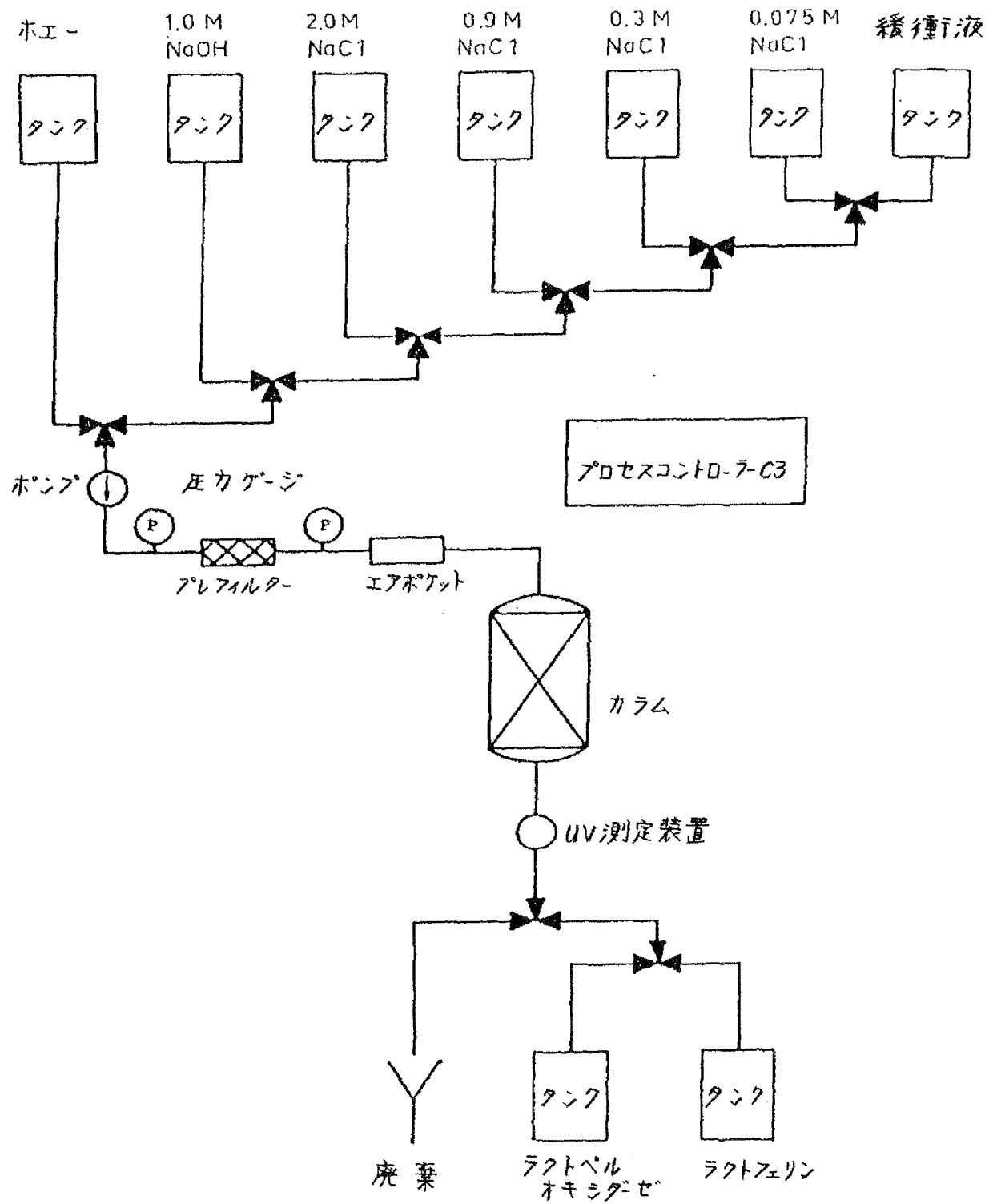
* 92が100%の純度に対応する最大値である。

対応する収率と純度をラクトフェリンについて得た（第3図参照）。

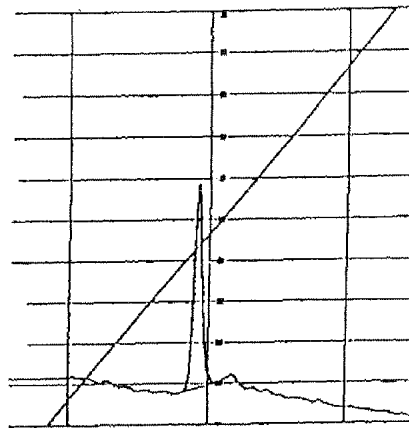
【第2図】



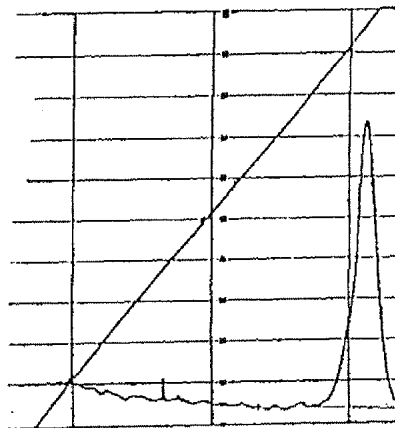
【第1図】



【第3図】



ラクトペルオキシダーゼ



ラクトフェリン

各成分の純度のクロマトグラフ試験



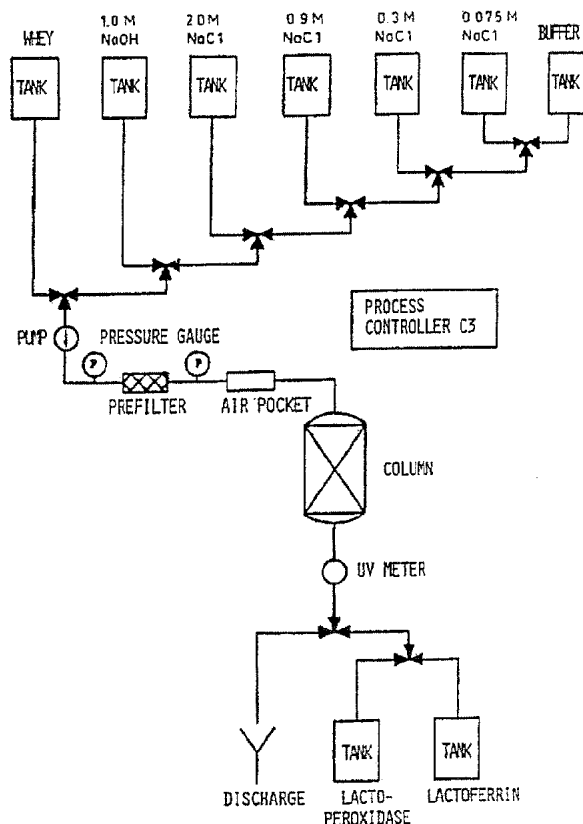
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification⁴ : A23J 1/20, C07K 3/28 C12N 9/08, A23C 9/146</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 89/ 04608 (43) International Publication Date: 1 June 1989 (01.06.89)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/SE88/00643 (22) International Filing Date: 25 November 1988 (25.11.88) (31) Priority Application Number: 8704719-7 (32) Priority Date: 27 November 1987 (27.11.87) (33) Priority Country: SE (71) Applicant (for all designated States except US): SVENSKA MEJERIERNAS RIKSFÖRENINGEN EKONOMI-AKTIEBOLAG [SE/SE]; Box 24, S-101 20 Stockholm (SE). (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): BURLING, Hans [SE/SE]; Hövdigavägen 15, S-223 75 Lund (SE). (74) Agent: AWAPATENT AB; Box 5117, S-200 71 Malmö (SE).</p>		<p>(81) Designated States: AT (European patent), AU, BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), DK, FI, FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), NO, SE (European patent), US. Published With international search report. With amended claims. In English translation (filed in Swedish).</p>

(54) Title: PROCESS FOR EXTRACTING PURE FRACTIONS OF LACTOPEROXIDASE AND LACTOFERRIN FROM MILK SERUM

(57) Abstract

A process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum is described. The milk serum is microfiltered and passed through a strong cation exchanger at a high rate of flow for selective adsorption of lactoperoxidase and lactoferrin, and then the lactoperoxidase and lactoferrin are eluted successively and selectively with saline solutions having different concentrations.



FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT Austria	FR France	ML Mali
AU Australia	GA Gabon	MR Mauritania
BB Barbados	GB United Kingdom	MW Malawi
BE Belgium	HU Hungary	NL Netherlands
BG Bulgaria	IT Italy	NO Norway
BJ Benin	JP Japan	RO Romania
BR Brazil	KP Democratic People's Republic of Korea	SD Sudan
CF Central African Republic	KR Republic of Korea	SE Sweden
CG Congo	LI Liechtenstein	SN Senegal
CH Switzerland	LK Sri Lanka	SU Soviet Union
CM Cameroon	LU Luxembourg	TD Chad
DE Germany, Federal Republic of	MC Monaco	TG Togo
DK Denmark	MG Madagascar	US United States of America
FI Finland		

PROCESS FOR EXTRACTING PURE FRACTIONS OF
LACTOPEROXIDASE AND LACTOFERRIN FROM MILK SERUM

The present invention relates to a process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum. By milk serum is meant both skim milk and whey.

5 In cheese-making, a large amount of whey is obtained as a by-product. Whey has a dry solids content of about 6%, which is composed approximately as follows:

		% by weight
10	Lactose	4.6
	Protein	0.6 thereof
	Lactoperoxidase	0.0020
	Lactoferrin	0.0030
	Fat	0.05 (after separation)
15	Salts	<u>0.7</u>
	Dry solids content about	6.0

The protein fraction which constitutes about 10-12% of the dry solids content is composed of a number of different protein components. The biggest
20 are β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum-albumin. Also a number of bioactive components belong to the protein fraction, for example immunoglobulins, lactoperoxidase, lactoferrin and lysozyme.

25 Both lactoperoxidase and lactoferrin have anti-microbial properties. There is a great interest in extracting natural antimicrobial substances to be used in new contexts in food technology and in the chemico-technical and medical fields.

30 There are low contents of these substances in skim milk and whey (also in the original milk). Lactoperoxidase and lactoferrin are present in contents of 15-50 mg/litre, depending on the lactation state of the cow. Large quantities of whey (milk) must thus

be filtered to facilitate extration of kilogram amounts of these bioactive components.

The process engineering conditions for isolating lactoperoxidase and lactoferrin, respectively, from milk/whey are based on the fact that the isoelectric point (pI) for these two proteins is about 9.5, while the main part of the whey proteins have isoelectric points around 5.1-5.4 and the casein at about 4.6. A fundamentally suitable process for separation of lactoperoxidase and lactoferrin is therefore to contact the milk/whey with a cation exchanger at a pH of < 6 for selective adsorption, and use is here made of the positive net charge of lactoperoxidase and lactoferrin, which distinguishes from that of other milk proteins which have a negative charge at this pH.

The traditional way of isolating lactoperoxidase and lactoferrin in small amounts for the purpose of research is to use the precipitation technique and ion exchange chromatography, frequently combined with gel filtration, see Morrison, M., Hamilton, H-B., Stotz, E., J. Biol. Chem. 228:767 (1957); and Morrison, M., Hultquist, P-E., J. Biol. Chem. 238-2847 (1963). These methods are not suited for preparing large amounts of the bioactive components at issue in an economically defensible manner.

U.S. patent specification 4,436,658 (Pevrosuset) discloses adsorption of lactoferrin from casein-free milk serum (whey) by means of a silica column. The pH of the milk serum is adjusted to 7.7-8.2 before adsorption on the column. Immunoglobulins, lactoferrin and lactoperoxidase adhere to the column. After the adsorption phase, elution with a diluted saline solution at a pH of < 4 takes place. No selective elution of the adsorbed proteins is obtained, particularly not regarding lactoperoxidase. A column holding about 5 g of silica compound can treat 1 litre of whey. This prior art process must be regarded as unsuitable for

application on an industrial scale.

Zagulski et al. in *Prace in Materialy Zootechniczne* 20, (1979), p. 87-103 describes a batchwise method of obtaining lactoferrin, in which use is made of
5 a weak cation exchanger which is mixed with milk. After equilibration, the ion exchanger is applied to a column for elution of the adsorbed proteins with a saline solution. The method thus is based on a batchwise process, and a further purification must
10 be carried out in a second ion exchange step to obtain a high purity of the lactoferrin.

A similar process is described in BE patent specification 901,672 (J.P. Prieels and R. Peipper, Oleofina S.A.). Here, use is made of an ion exchanger
15 based on calcium alginate, in which the ion exchange functionality has been obtained by admixture of oxides of zirconium, titanium, quartz or aluminium. The milk/whey is contacted with the ion exchanger in a packed column or by mixing in a tank, whereby proteins having
20 an isoelectric point above 7.5 are adsorbed. After equilibration, the gel is separated mechanically and supplied to a means for washing and eluting with a calcium chloride solution. All fluids contacting the calcium alginate gel must contain at least 0.1% CaCl_2
25 to prevent the gel from being dissolved. No fractionating of lactoperoxidase and lactoferrin is obtained in the elution, but the fractionating must be carried out in a separate purification step.

As a reason for not working with a commercially
30 established ion exchange technique in a column process, the above-mentioned BE patent specification mentions the unsurmountable difficulties of clogging of the ion exchanger caused by the occurrence of particles of globular fat and protein aggregate in the medium.

35 GB patent specification 2,179,947 discloses a process for the extraction of lactotransferrin from milk. The process is carried out such that the whey

is subjected to ultrafiltration, whereby the protein content of the whey (including the lactotransferrin) is concentrated about 5 times, whereupon its pH and ionic strength are adjusted. The milk serum thus treated
5 is passed at a very low rate (about 0.03 bed volumes per minute) through an ion exchange column, preferably a weak cation exchanger. The column is eluted, still at a low rate, with a solution having an ionic strength gradient which increases up to 0.4 M, when the lacto-
10 transferrin is eluted. This is a small-scale process which is not suitable for industrial preparation of lactoferrin. The use of a weak cation exchanger results in a poor capacity. Whey in an amount of 100 bed volumes, converted into a natural dry solids content, can pass
15 through the ion exchange column between each elution. The problem of clogging of the ion exchange filter caused by fat and protein particles has not been solved by this prior art process.

The following requirements can be placed on an
20 industrially applicable process for economic recovery of lactoperoxidase and lactoferrin from whey/skim milk:

1) High selective capacity of the adsorption mass.

Since the contents of lactoperoxidase/lactoferrin are low in milk serum, the volumes of milk serum
25 which can be treated in one elution, must be large.

2) High rate of flow in the adsorption phase. (Normal chromatographic processes usually work at low rates, 0.01-0.10 bed volumes per minute. The reason is
30 that owing to the small particle size, the bed usually gives high pressure drops, and that the reaction kinetics for the adsorption process frequently require a high rate of flow.

3) The process must be hygienic, which means that the adsorption mass must stand at least a lye
35 treatment at pH 13-14.

The object of the present invention is to achieve a process that satisfies the above-mentioned requirements

for extraction of pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum (whey) on a large scale and at a low cost.

The present invention relates to a process for
5 extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum, said process being characterised by microfiltering the milk serum, passing it through a strong cation exchanger at a high rate of flow for selective adsorption of lactoperoxidase and lactoferrin,
10 and successively eluting the lactoperoxidase and the lactoferrin selectively with saline solutions having different concentrations.

According to the invention, a process is provided for preparing pure fractions of two different serum
15 proteins in a single ion exchange step. This has not previously been achieved on an industrial scale. Prior art methods for extracting these proteins on an industrial scale have required two or three purification steps.

The above-mentioned problems of clogging of the
20 ion exchanger, which is caused by the occurrence of particles, such as globular fat and protein aggregates, in the serum or whey, are solved according the invention in that the milk serum (whey) is microfiltered, for example in a so-called cross-flow process, before
25 contacting the ion exchange bed. By choosing a suitable pore size of the microfilter, fat and protein aggregate particles which cause clogging, can be eliminated. A suitable microfilter has a pore diameter of 0.10-2 μm , preferably 0.4-1.5 μm .

30 As the starting material for the process according to the invention, milk serum (whey) is used, i.e. milk freed from fat and casein. The milk serum is first treated by microfiltration for removal of residues of fat and protein aggregate particles, preferably
35 in a so-called cross-flow process. The microfiltered milk serum is then passed at a high rate (about 1-1.5 bed volumes per minute) through a column packed with

a strong cation exchanger which selectively adsorbs lactoperoxidase and lactoferrin. This cation exchanger has excellent rate and adsorption kinetic properties and a capacity of about 1000 bed volumes of milk serum.

5 This means that about 1000 bed volumes of milk serum can pass before the lactoperoxidase which has the weakest bond, breaks through, i.e. the ion exchange mass is saturated with these proteins. Merely a slight increase of the pressure drop occurs between the be-
10 ginning and the end of the adsorption phase.

The elution of the ion exchange mass is started by washing the milk serum out of the column with a buffer, preferably a phosphate buffer at the pH of the milk serum, 6.5. Subsequently, impurities, if
15 any, are eluted with a buffer solution containing a weak saline solution, preferably of an inorganic alkali, alkaline earth or ammonium salt, for example 0.075 M NaCl.

After this preparatory elution, the desired proteins
20 are selectively eluted with buffer solutions containing saline solutions selected from the above-mentioned salts, at different concentrations. Thus, the elution of lactoperoxidase is performed at a salt concentration in the range of 0.10-0.4 M, and of lactoferrin at
25 a salt concentration within 0.5-2 M.

After this treatment, the proteins concerned have been concentrated about 500 times.

The pure protein fractions are collected, and then a further concentration is preferably effected by
30 ultrafiltration followed by desalination and freeze-drying so as to obtain a commercial product consisting of about 90% pure protein fractions.

For the production of 1 kg lactoperoxidase and 1 kg lactoferrin, about 65 and, respectively, 45 m³ of
35 whey are required. The purity of the extracted components exceeds 90%. This is obtained by a suitable choice of ion exchanger and a careful choice of

adsorption and elution conditions in which the pH and the salt concentrations are important parameters.

The invention will now be described in detail by means of the Example below and the accompanying drawings.

5 Fig. 1 is a schematic view of a preferred embodiment of the process according to the invention;

Fig. 2 illustrates the UV absorption spectrum when eluting lactoperoxidase and lactoferrin from an ion exchange column; and

10 Fig. 3 are chromatograms showing the purity of lactoperoxidase and lactoferrin after the fractionating according to the invention has been carried out.

Example

15 100 litres of pasteurised and sludge-centrifuged sweet whey at pH 6.5 were microfiltered in a cross-flow process at 50°C. By the microfiltration, remaining residues of globular fat were removed together with occurring protein aggregates. The pore size of the microfilter was 1.4 µm.

20 After cooling, the whey was passed through an ion exchange column packed with 80 ml of a specially treated strong cation exchanger (S-Sepharose, fast flow, Pharmacia) on an agarose basis. The height of the bed was about 4.1 cm, and the rate through the column was 100 ml/minute, corresponding to a rate of 1.25
25 bed volumes per minute. The pressure drop before the column at the beginning of the run was 0.26 bar. 15 h later, the rate was still 100 ml/minute at a pressure drop of 0.28 bar. The lactoperoxidase break-through
30 occurred when about 80-90 litres of whey had been passed through the column, i.e. about 1000 bed volumes.

Subsequently, the flow of whey was interrupted, and the eluting phase was started by washing the whey out of the column with a phosphate buffer, 0.01
35 M KH_2PO_4 , pH 6.5, followed by elution of impurities from the ion exchanger with a phosphate buffer containing 0.075 M NaCl (Fig. 1). The lactoperoxidase

was eluted with a phosphate buffer containing 0.3 M NaCl, and then the lactoferrin was eluted with a phosphate buffer containing 0.9 M NaCl (see Fig. 2).

After the fractions had been collected, they were
5 desalted by gel filtration in a Sephadex column and were finally freeze-dried.

The ion exchange column was cleaned by washing first with 2.0 M NaCl and then with 1.0 M NaOH, whereupon the column was ready for the next run.

10 - Yield of lactoperoxidase after ion exchange: 96.5%.

- Purity of the collected fraction after elution:

$$A_{412}/A_{280} = 0.84^*$$

- Total yield in the process after
freeze-drying, calculated as activity: 90%

15 - Purity of the freeze-dried

preparation: $A_{412}/A_{280} = 0.87^*$

*0.92 is the maximum quota for 100% purity.

The corresponding yield and purity were obtained for the lactoferrin (see Fig. 3).

CLAIMS

1. A process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum, characterised by microfiltering the milk serum, passing it through a strong cation exchanger at a high rate of flow for selective adsorption of lactoperoxidase and lactoferrin, and then successively and selectively eluting the lactoperoxidase and the lactoferrin with saline solutions having different concentrations.

2. The process as claimed in claim 1, characterised in that the lactoperoxidase is selectively eluted with a saline solution having a concentration of 0.10-0.4 M at a pH of about 6.5.

3. The process as claimed in claim 1 or 2, characterised in that the lactoferrin is selectively eluted with a saline solution having a concentration of 0.5-2 M.

4. The process as claimed in one or more of the preceding claims, characterised in that before the elution of lactoperoxidase, the cation exchanger is eluted with a saline solution having a concentration of 0.01-0.15 M, preferably a solution of an inorganic alkali, alkaline earth or ammonium salt.

5. The process as claimed in one or more of the preceding claims, characterised in that the pH of the milk serum is adjusted to 5.9-9.0, preferably about 6.5, before being passed through the cation exchanger.

6. The process as claimed in one or more of the preceding claims, characterised in that the microfiltration is carried out in a microfilter having a pore diameter of 0.10-2 μm , preferably 0.4-1.5 μm .

7. The process as claimed in one or more of the preceding claims, characterised in that the saline solutions with eluted lactoperoxidase and lactoferrin, respectively, are concentrated, desalted
5 and freeze-dried.

AMENDED CLAIMS

[received by the International Bureau on 15 April 1989 (15.04.89)
original claims 1 - 7 replaced by new claims 1 - 5 (1 page)]

1. A process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum, c h a -
r a c t e r i s e d by microfiltering the milk serum,
passing it through a bed of a strong cation exchanger
5 at a high rate of flow of about 1-1.5 bed volumes/minute
for selective adsorption of lactoperoxidase and lacto-
ferrin, and then successively and selectively eluting
the lactoperoxidase with a saline solution having a
concentration of 0.10-0.4 M at a pH of about 6.5 and
10 the lactoferrin with a saline solution having a con-
centration of 0.5-2 M.

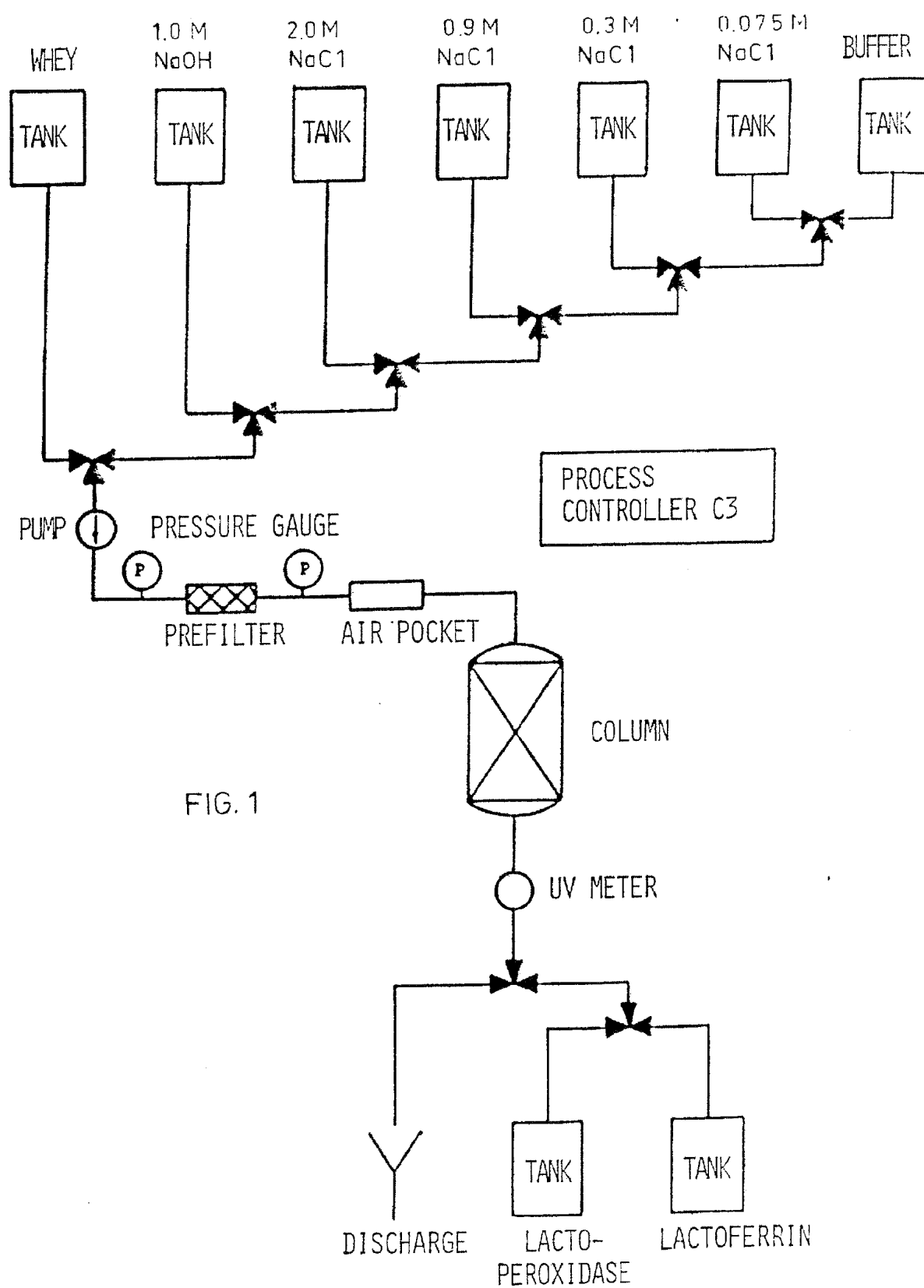
2. The process as claimed in claim 1, c h a r -
a c t e r i s e d in that before the elution of lacto-
peroxidase, the cation exchanger is eluted with a
15 saline solution having a concentration of 0.01-0.15 M,
preferably a solution of an inorganic alkali, alkaline
earth or ammonium salt.

3. The process as claimed in claim 1 or 2, c h a r -
a c t e r i s e d in that the pH of the milk serum
20 is adjusted to 5.9-9.0, preferably about 6.5, before
being passed through the cation exchanger.

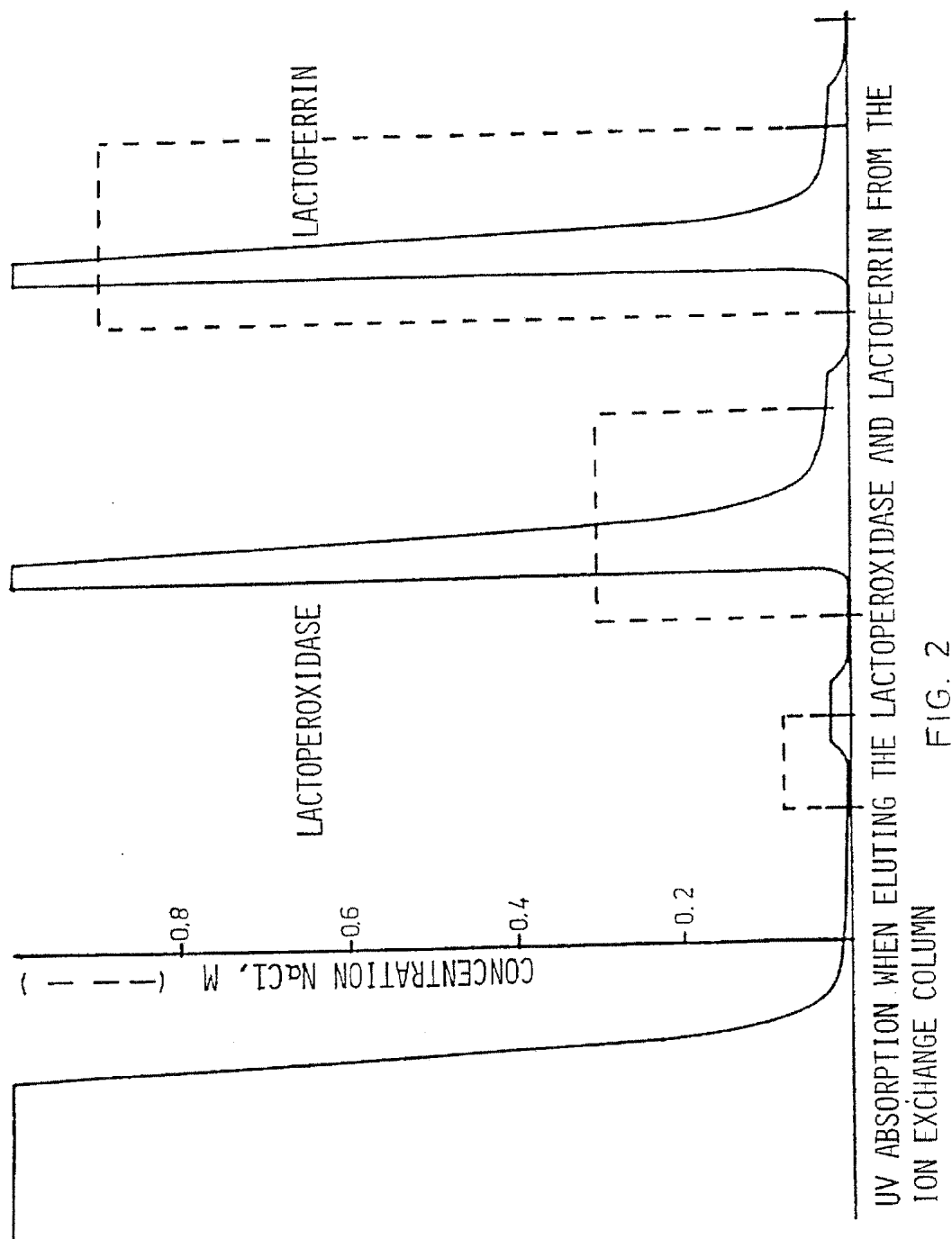
4. The process as claimed in one or more of the
preceding claims, c h a r a c t e r i s e d in that
the microfiltration is carried out in a microfilter
25 having a pore diameter of 0.10-2 μm , preferably
0.4-1.5 μm .

5. The process as claimed in one or more of the
preceding claims, c h a r a c t e r i s e d in that
the saline solutions with eluted lactoperoxidase and
30 lactoferrin, respectively, are concentrated, desalted
and freeze-dried.

1/3

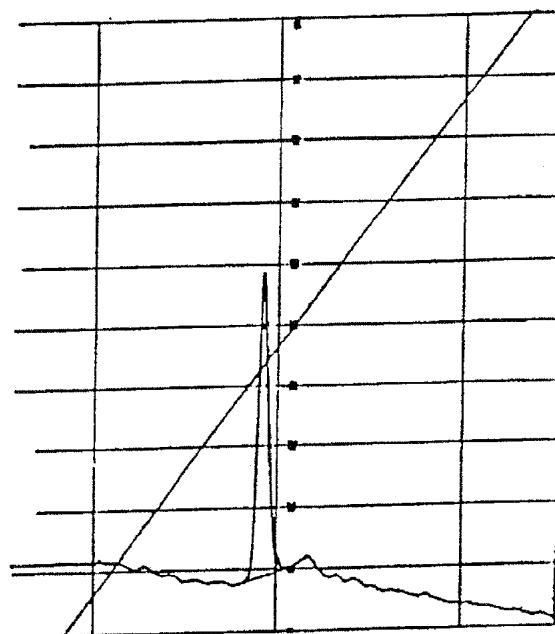


2/3

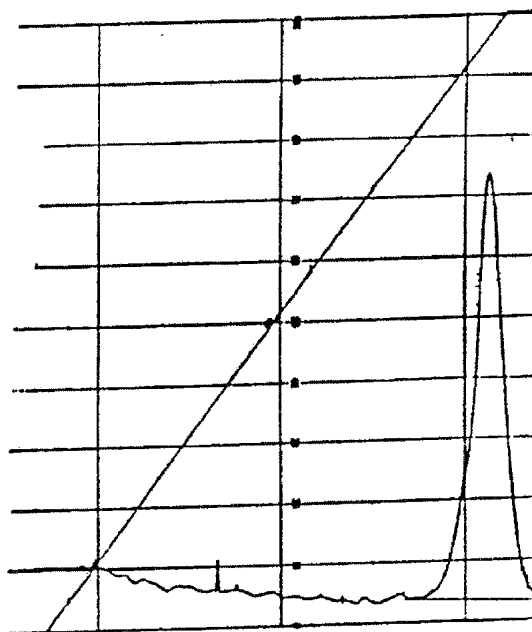


3/3

FIG. 3



LACTOPEROXIDASE



LACTOFERRIN

CHROMATOGRAPHIC CHECK FOR THE PURITY
OF THE FRACTIONS

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/SE88/00643

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC 4		
A 23 J 1/20; C 07 K 3/28; C 12 N 9/08; A 23 C 9/146		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched †		
Classification System ‡	Classification Symbols	
IPC 4	A 23 C 9/14 - /148; A 23 J 1/20; C 07 K 3/20 - /28; C 07 K 15/14; C 12 N 9/08 .../...	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included In the Fields Searched §		
SE, NO, DK, FI classes as above. Data base search: WPI/L, claims, CA.		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¶		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡‡	Relevant to Claim No. ††
Y	GB, A, 2 179 947 (ROUSSEL-UCLAF) 18 March 1987 & BE, 905087 FR, 2584727 DE, 3623474 JP, 62019523 SE, 8602877 NL, 8601814 LU, 86508 CH, 668428	1-7
Y	US, A, 3 896 241 (THE COCA-COLA COMPANY) 22 July 1975 & NL, 7211742 FR, 2151042 DE, 2243189 BE, 788120 GB, 1403086 CH, 563123 AU, 459239 CA, 991010 .../...	1-7
<p>* Special categories of cited documents: 10</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
1989-02-06	1989-02-14	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Swedish Patent Office	Gronne Siösteen Yvonne Siösteen	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	US, A, 4 436 658 (SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE) 13 March 1984 & GB, 2098998 FR, 2505615 DE, 3218348 BE, 893156 NL, 8201947 SE, 8203056 JP, 58028233 CA, 1171723 CH, 650905 AU, 557353	1-7
Y	Rev. roum Biochim 21, 2, 1984, Buzila et al "The simultaneous preparation of the active components from human milk" p 81-91	1-7
Y	Chemical abstracts, Vol 105, 1986, abstract no 41350u, J Chromatogr., 1986, 358(2), 429-33(Eng)	1-7

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

II Fields searched (cont)

US CI 260:112,122,123;
435:192

V. ☐ **OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out. Specifically:

3. ☐ Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ **OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.